FLEX
Polyclonal Rabbit
Anti-Human CD3
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Nº de catálogo IS503

Uso previsto

Para uso en diagnóstico *in vitro*.

FLEX Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), está indicado para su uso en inmunohistoquímica junto con los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus. Este anticuerpo resulta útil en la identificación de las células T y neoplasias relacionadas (1, 2). La interpretación clínica de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un anatomopatólogo calificado dentro del contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Sinónimos del antígeno

T3, complejo CD3 (3).

Resumen y explicación

El CD3 consta de por lo menos cuatro componentes diferentes (γ, δ, ε, ζ) de 20–28 kDa. En la superficie celular de los linfocitos, el CD3 se asocia sin covalencia con el receptor de células T (TCR). Se cree que los componentes del CD3 del complejo TCR/CD3 intervienen en transducción de la señal sobre el reconocimiento del antígeno por la TCR (4).

Las células T expresan el CD3 en el timo, la médula ósea, el tejido linfoide periférico y la sangre (5, 6). Se sabe que el único otro tipo de células normales marcadas por los anticuerpos contra CD3 son las células de Purkinje en el cerebelo (7). El antígeno CD3 se detecta primero en timocitos precoces, y su aparición probablemente representa uno de los primeros signos de compromiso del linaje de células T (5). En los timocitos inmaduros, la expresión de CD3 es exclusivamente citoplasmática; el CD3 asociado con la membrana aparece posteriormente, cuando madura la célula (5).

La mayoría de las neoplasias de células T expresan el antígeno CD3, mientras que éste se encuentra ausente de los tumores malignos linfoides de células no T (8). De acuerdo con el patrón de síntesis del antígeno en timocitos normales, el primer sitio donde se detecta el CD3 dentro de las células neoplásicas es el citoplasma celular (5). Se ha considerado que el CD3 es un marcador fundamental en la evaluación inicial de los trastornos linfoproliferativos crónicos (9). La leucemia de linfocitos granulares grandes de células T (T-LGL) se caracteriza por el inmunofenotipo CD3+/CD57+/CD56- y la reordenación clonal de los genes receptores de células T (10).
Consulte las *Instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica* de Dako o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHQ para: (1) Principio del procedimiento, (2) Material necesario pero no suministrado, (3) Almacenamiento, (4) Preparación de la muestra, (5) Procedimiento de tinción, (6) Control de calidad, (7) Solución de problemas, (8) Interpretación de la tinción y (9) Limitaciones generales.

Reactivo suministrado

El anticuerpo policlonal de conejo listo para su uso se suministra en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida de sodio.

Inmunógeno

Péptido sintético compuesto de 156–168 aminoácidos de la parte citoplásmatica de la cadena ε del CD3 humano unido a la tiroglobulina (1).

Especificidad

En la transferencia de Western, el anticuerpo detecta bandas de los pesos moleculares esperados para los antígenos CD3 (2). El anticuerpo reconoce el CD3ε tanto en la línea celular T (Jurkat) como en una línea celular citolítica natural (NK11), pero no reacciona con lisados preparados de varias líneas de células B (Raji, Ramos y JY), con una línea celular mieloide (U937) o con una línea celular de carcinoma de colon (Colo-205) (11).

En la inmunoprecipitación de lisados Nonidet P40 de linfoblastos T con superficie yodada, el anticuerpo precipita las cadenas γ (26 kDa), δ (21 kDa) y ε (19 kDa) de la molécula de CD3, con un patrón de precipitación similar al observado con el anticuerpo bien caracterizado, monoclonal mouse anti-human CD3, clon UCHT1 (1).

En el ELISA, el anticuerpo marca el péptido CD3 utilizado como inmunógeno.

Precauciones

1. Para usuarios profesionales.
2. Este producto contiene azida de sodio (NaN_3), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. Aunque a las concentraciones presentes en el producto no está clasificada como peligrosa, la azida de sodio puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando acumulaciones de azidas metálicas altamente explosivas. Una vez desechado el producto, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.
3. Al igual que con cualquier producto de origen biológico, deberán aplicarse los procedimientos de manipulación adecuados.
4. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel.
5. La solución que no se utilice deberá desecharse de acuerdo con las normativas locales, provinciales y nacionales.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Almacenamiento

Almacenar a 2–8 ºC. No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario deberá comprobar dichas condiciones. No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad de este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán analizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. En caso de observarse una coloración inesperada que no puede ser explicada por las variaciones en los procedimientos del laboratorio y se sospeche un problema con el anticuerpo, comuníquese con la asistencia técnica de Dako.

Preparación de las muestras, incluido material necesario pero no suministrado

El anticuerpo puede utilizarse para marcar cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Las muestras de tejido deben cortarse en secciones de aproximadamente 4 µm.

Se requiere el tratamiento previo con recuperación del epítopo inducida por calor (HIER) usando Dako PT Link (nº de catálogo PT100/PT101). Para más detalles, consulte la Guía del usuario de PT Link. Se obtienen resultados óptimos al pretratar los tejidos con EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (nº de catálogo K8010/K8004).

Cortes incluidos en parafina: se recomienda el tratamiento previo de los cortes de tejido fijados en formol e incluidos en parafina siguiendo el procedimiento de preparación de la muestra 3 en 1 para Dako PT Link. Siga el procedimiento previo al tratamiento explicado en el prospecto de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (nº de catálogo K8010/K8004). Nota: Después de la tinción, se deben deshidratar, enjuagar y montar los cortes usando un medio de montaje permanente.

Cortes desparafinados: se recomienda el tratamiento previo de los cortes de tejido desparafinados, fijados en formol e incluidos en parafina usando Dako PT Link y siguiendo el mismo procedimiento descrito para los cortes incluidos en parafina. Tras la tinción, los portaobjetos deben montarse utilizando un medio de montaje acuoso o permanente.

Los cortes de tejido no se deben secar durante el tratamiento ni durante el siguiente procedimiento de tinción inmunohistoquímica. Para una mejor adherencia de los cortes de tejidos a los portaobjetos, se recomienda el uso de FLEX IHC Microscope Slides (nº de catálogo K8020).

Procedimiento de tinción, incluido material necesario pero no suministrado

El sistema de visualización recomendado es EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Nº de catálogo K8010). Los pasos de tinción y los tiempos de incubación han sido preprogramados en el software de los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus utilizando los siguientes protocolos:
Plantilla del protocolo: FLEXRTU2 (volumen de dispensado de 200 µL) o FLEXRTU3 (volumen de dispensado de 300 µL).

Autoprograma: CD3 (sin contratinción) o CD3H (con contratinción).

El paso Auxiliar debe configurarse a “tampón de enjuague” en sesiones de tinción con ≤ 10 portaobjetos. Para sesiones de tinción con >10 portaobjetos, el paso Auxiliar debe configurarse a “ninguno”. Esto garantiza tiempos de lavado similares.

Todos los pasos de incubación deben realizarse a temperatura ambiente. Consulte el Manual del usuario para más detalles sobre el instrumento correspondiente. Si todavía no están disponibles los protocolos en el instrumento Dako Autostainer utilizado, comuníquese con el servicio técnico de Dako.

Las condiciones óptimas pueden variar según la muestra y el método de preparación, y deberán determinarse individualmente en cada laboratorio. Si el patólogo encargado de la evaluación desea otra intensidad de tinción, se puede solicitar información a un especialista en aplicaciones de Dako o a un especialista del servicio técnico para reprogramar el protocolo. Verifique que el rendimiento del protocolo ajustado siga siendo válido confirmando que el patrón de tinción sea idéntico al descrito en “Características de resultados”.

Se recomienda la contratinción en hematoxilina usando EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo K8018). Se recomienda un medio de montaje no acuoso permanente.

Los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea empleando el mismo protocolo que para las muestras del paciente. El tejido de control positivo debe incluir amígdala, y las células y estructuras deben mostrar patrones de reacción como se describe para este tejido en “Características de resultados” en todas las muestras positivas. El reactivo de control negativo recomendado es FLEX Negative Control, Rabbit (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo IS600).

Interpretación de la tinción

Las células marcadas por el anticuerpo muestran tinción citoplasmática y/o de la membrana.

Características de resultados

Tejidos normales: El anticuerpo marca las células T de diversos tejidos, incluidos amígdala y colon. Las células T en las áreas interfoliculares de la amígdala muestran una reacción de tinción de moderada a fuerte, mientras que las células T en centros germinales de amígdala y en el epitelio del colon muestran una reacción de leve a moderada.

Tejidos anormales: El anticuerpo marcó 73/96 neoplasias de células T, incluidas 7/9 linfoblásticas, 25/35 pleomórficas, 5/5 inmunoblásticas, 5/5 angioinmunoblásticas del tipo linfoadenopatía, 2/2 linfomas de zona T, 19/19 micosis fungoides/síndromes de Sézary, 2/3 linfomas de Lennert, 4/13 linfomas anaplásicos de células grandes Ki-1 positivos, 3/4 papulosis linfomatoides y 1/1 linfoma asociado con enfermedad celíaca (1). El anticuerpo marcó 149/149 casos de leucemias/linfomas linfoblásticas agudas (ALL) de células T (precursoras). En 131/149 casos, el 100% de las células fueron positivas; en 14 casos entre el 50 y el 90% de las células fueron positivas, y en 4 casos menos del 50% de las células fueron positivas. No se observó ningún marcado en 68/68 casos de ALL de células B (precursoras), aparte de las células T infiltrantes reactivas (2).

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Referencias bibliográficas

1. Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, et al. Detection of cells in paraffin wax embedded tissue, using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. J Clin Pathol 1989; 42:1194–1200.
2. Pilozzi E, Pulford K, Jones M, Müller-Hermelink H-K, Falini B, Ralfkiaer E, et al. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. J Pathol 1988; 186:140–3.
3. CD guide In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10–14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1111.
4. Jacobs H. Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 complexes: decamers with differential signalling properties? Immunol Today 1997; 18:565–9.
5. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol 1987; 138:648–55.
6. Tunnacliffe HA, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, De la Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21–25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 295–6.
7. Garson JA, Beverley PC, Coakham HB, Harper EI. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. Nature 1982; 298:375–7.
8. Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet 1986;i:761–5.
9. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001; 46:23–7.
10. Kingreen D, Siegert W. Chronic lymphatic leukemias of T and NK cell type. Leukemia 1997; 11 Suppl 2:S46–9.
11. Lanier LL, Chang C, Spitz H, Pillips JH. Expression of cytoplasmic CD3ε proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3γ, δ, ε complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. J Immunol 1992; 149:1876–80.

Explicación de los símbolos

REF	Referencia	2 °C 8 °C	Limitación de temperatura		Fecha de caducidad
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*	Σ	Contiene suficiente para <n> ensayos		Fabricante
	Consulte las instrucciones de uso	LOT	Código del lote		

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17